

Universitatea de Științele Vieții “Regele Mihai I” din Timișoara



Școala Doctorală Ingineria Resurselor Vegetale și Animale

**EUGENIA R. BUTUCEL**

# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**UTILIZAREA BIOCIDELOR ÎN REDUCEREA  
PATOGENILOR ÎN ADĂPOSTURI ȘI PREVENIREA  
INFECȚIILOR LA ANIMALELE DE FERMĂ**

**Conducători Științifici:**

**PROF. DR. ING. LAVINIA ȘTEF**

**PROF. DR. ING. NICOLAE CORCIONIVOSCHI**

**T i m i ș o a r a**

**2 0 2 4**

University of Life Sciences „*King Mihai I*” from Timișoara



Doctoral School of Plant and Animal Resources Engineering

**EUGENIA R. BUTUCEL**

# **Ph.D. THESIS**

**THE APPLICATION OF BIOCIDES FOR DECREASING  
THE NUMBER OF PATHOGENS IN SHELTERS AND  
PREVENTING INFECTIONS IN FARM ANIMALS**

**Scientific Coordinators:**

**PROF. DR. ENG. LAVINIA ȘTEF**

**PROF. DR. ENG. NICOLAE CORCIONIVOSCHI**

**Timișoara**

**2024**

## REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# UTILIZAREA BIOCIDELOR ÎN REDUCEREA PATOGENILOR ÎN ADĂPOSTURI ȘI PREVENIREA INFECȚIILOR LA ANIMALELE DE FERMĂ

*Drd. Ing. BUTUCEL Eugenia*

*Conducători științifici:*

*Prof. Dr. Ing. ȘTEF Lavinia*

*Prof. Dr. Ing. CORCIONIVOSCHI Nicolae*

**CUVINTE CHEIE:** *patogeni, biofilm bacterian, fitochimice, probiotice, prebiotice, expresia genelor, activitatea antioxidantă, butirat, rezistența electrică transepitelială, substanță polimerică extracelulară, stresul oxidativ, specii reactive la oxigen, infecție orală, virulență, celule epiteliale primare*

Teza de doctorat cu titlul „Utilizarea biocidelor în reducerea patogenilor în adăposturi și prevenirea infecțiilor la animalele de fermă” este structurată în două părți principale: partea de documentare bibliografică și partea de contribuții personale. Teza de doctorat cuprinde un număr de 6 capitole, la care se adaugă referințele bibliografice utilizate. Lucrarea integrală însumează un număr de 130 pagini, 8 tabele, 21 figuri și 310 referințe bibliografice.

Prezența agenților infecțioși în alimente și apă reprezintă o preocupare majoră pentru industria alimentară, personal medical și consumatori, deoarece creșterea rezistenței patogenilor la substanțele biocide a avut ca rezultat consecințe economice semnificative, rate mai mari de mortalitate, cheltuieli crescute pentru tratamente și lipsa de încredere în medicină. Agricultură, un rezervor major de patogeni rezistenți, este adesea martor la formarea de biofilme și rezistență atât față de biocide, cât și față de antibiotice, ceea ce face dezinsecția o componentă vitală a strategiei generale de biosecuritate menită să prevină și să elimine o varietate de patogeni care aduc daune în agricultură, sănătate și industria alimentară.

Studiile recente au sugerat potențialul de rezistență încrucișată a bacteriilor patogene atât la antibiotice, cât și la biocide, subliniind necesitatea unei utilizări mai judicioase a acestor substanțe și a prevenirii contaminării apei și a solului, ceea ce poate duce la eliberarea necontrolată în mediu și la apariția rezistenței bacteriene. Rezistența bacteriană la biocide poate proveni din mutații genetice, modificări ale învelișului celular, activarea pompei de eflux sau expresia enzimelor care descompun biocidele. În consecință, există o căutare continuă pentru biocide noi și eficiente derivate din surse naturale, inclusiv plante, peptide, enzime și produse biocide complet noi, pentru a aborda această provocare în continuă creștere.

Teza de doctorat cu titlul "*Utilizarea biocidelor în reducerea patogenilor în adăposturi și prevenirea infecțiilor la animalele de fermă*" face parte din strategia de cercetare a Universității de Științele Vieții "*Regele Mihai I*" din Timișoara, care colaborează cu Institutul de Bioștiințe Agroalimentare din Belfast, Regatul Unit.

Această cercetare are o semnificație practică substanțială, deoarece explorează potențialul produselor antimicrobiene inovatoare cu scopul de a îmbunătăți standardele de igienă în mediile industriale, inclusiv în fermele de animale. Dezvoltarea de noi produse cu proprietăți bactericide și bacteriostatice are potențialul de a aduce beneficii fermierilor. Aceste substanțe pot reduce în mod eficient colonizarea microbiotei animale de către agenții patogeni ai speciilor ESKAPE, cum ar fi *Escherichia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Listeria* și *Campylobacter*, despre care se știe că provoacă infecții alimentare și afecțiuni gastrointestinale severe. Această lucrare de doctorat a abordat nevoia critică de a găsi alternative la antibiotice și dezinfectanții obișnuiți utilizați în agricultură, din cauza provocării tot mai mari a rezistenței antimicrobiene.

**Obiectivul principal** al acestei teze de doctorat a fost de a aborda provocările reprezentate de rezistența la preparate antimicrobiene în zootehnie prin explorarea soluțiilor antimicrobiene inovatoare, oferind potențiale beneficii atât pentru menținerea sănătății cât și a performanțelor productive ale animalelor.

Această lucrare constituie o noutate în domeniul produselor antimicrobiene, concentrându-se pe compuși derivați din plante, cum ar fi polifenolii, uleiurile esențiale și acizii organici ca alternative la antibiotice. Această abordare inovatoare crează nevoia urgentă de a reduce dependența de antibiotice și de a combate rezistența la antibiotice. Utilizarea nanoemulsificării pentru a produce aceste preparate reprezintă un progres semnificativ, făcându-le foarte solubile și aplicabile în diverse industrii.

Pentru a atinge scopul cercetării tezei, au fost definite mai multe **obiective**:

- Efectuarea unei analize extinse a literaturii de specialitate pentru a înțelege mecanismele biologice de acțiune a biocidelor împotriva agenților patogeni comuni de origine alimentară;
- Investigarea rolului biosecurității și practicilor de management al fermelor în atenuarea formării de biofilme bacteriene în fermele de animale;
- Examinarea impactului unui agent antimicrobian natural asupra virulenței, aderenței și invaziei agenților microbieni ca și *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* și *Enterococcus faecalis* în celulele epiteliale primare orale canine;
- Explorarea mecanismelor moleculare care stau la baza proprietăților antimicrobiene ale unui amestec natural și a capacității acestuia de a inhiba formarea biofilmului de către *Legionella pneumophila* și examinarea impactului acestuia asupra expresiei genelor și comportamentului bacterian;
- Evaluarea potențialului *in vitro* al amestecului antimicrobian în promovarea creșterii bacteriilor comensale *Faecalibacterium prausnitzii* și evaluarea eficacității acestuia în combaterea *Vibrio parahaemolyticus* folosind celulele intestinale primare de creveți (SGP) ca sistem model.

Teza de doctorat intitulată "*Utilizarea biocidelor în reducerea patogenilor în adăposturi și prevenirea infecțiilor la animalele de fermă*" este structurată în două părți principale. Prima parte cuprinde **3 capitole** în care se prezintă stadiul actual al cunoașterii în conformitate cu obiectivele propuse, tratând astfel aspecte legate de managementul fermelor și strategiilor de biosecuritate, biocidele utilizate la momentul actual în industrie precum

și mecanismul lor de acțiune contra bacteriilor patogene formatoare de biofilm de origine alimentară. Partea a doua cuprinde **3 capitole** și reflectă munca doctorală de cercetare, materiale și metode de lucru utilizate, rezultatele obținute, discuții și concluzii

Prima parte a tezei de doctorat cuprinde un număr de 29 pagini, ceea ce reprezintă în jur de 36 % din volumul total al tezei.

În **Capitolul 1**, intitulat „**Eficacitatea intervențiilor și măsurilor asociate cu biosecuritate în ferme**”, sunt prezentate strategiile recente de intervenție care vizează reducerea și combaterea formării de biofilme bacteriene în fermele zootehnice. Scopul acestui capitol a fost de a sublinia importanța biosecurității și a practicilor de management al fermelor și de a evalua impactul acestora asupra formării biofilmului bacterian.

**Capitolul 2**, având ca și titlu „**Biocidele ca strategie durabilă împotriva bacteriilor patogene**”, descrie biocide cu efecte inhibitoare împotriva bacteriilor de origine alimentară și anume, biocidele pe bază de metale; aldehide, alcooli, fenoli și bisfenoli; halogeni, peroxizi și acizi organici; QACs, și fitochimice. Utilizarea și dezvoltarea responsabilă a acestor biocide este crucială pentru dezinfectia eficientă și prevenirea bolilor. A doua parte a acestui capitol abordează activitatea antimicrobiană a produsului biocidal. Acest capitol descrie o serie de procese implicate în acțiunea unui agent antimicrobian asupra bacteriilor patogene S-a adevărat faptul că efectul antimicrobian se bazează pe interacțiunea dinamică dintre substanță activă și ținte specifice și interiorul celulei microbiene.

**Capitolul 3**, intitulat „**Stadiul actual al cercetării în domeniul utilizării biocidelor împotriva bacteriilor patogene transmise prin alimente**”, descrie mecanismele biologice de acțiune a biocidelor pentru cei mai comuni agenți patogeni de origine alimentară (de exemplu, *Escherichia* spp., *Staphylococcus* spp., *Campylobacter* spp., *Klebsiella* spp).

Următoarele capitole, respectiv partea de cercetări proprii, prezintă studiile efectuate pe parcursul anilor de doctorat. Cercetările au fost efectuate în laboratoarele Institutului de Bioștiințe Agroalimentare din Belfast, Filiala Bacteriologie, localitatea Belfast, Marea Britanie. Materialul biologic utilizat în cadrul experimentelor a fost reprezentat de bacterii patogene din colecția laboratorului AFBI. Partea a II-a lucrării de doctorat se extinde pe 48 pagini, ceea ce reprezintă 64 % din volumul total al tezei, cuprinzând 1 tabel și 15 figuri.

În **Capitolul 4** a fost urmărit impactul substanțelor antimicrobiene naturale asupra inhibiției antioxidante a răspunsului inflamator mediat de COX-2 în celulele orale primare infectate cu *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* și *Enterococcus faecalis*. Unul dintre scopurile fundamentale ale acestui capitol a fost evaluarea concentrației minime inhibitoare (CMI) și a concentrației minime bactericide (CMB) ale soluției antimicrobiene (Auraguard) împotriva agenților patogeni relevanți. Activitatea antimicrobiană a fost evidentă la o concentrație minimă inhibitoare de 0.25% pentru toate tulpinile testate, urmată de o concentrație minimă bactericidă de 0.50%. Pentru a evalua impactul subinhibitoriu, s-a ales o concentrație de 0.125%, care nu a afectat creșterea bacteriană, dar a avut un efect asupra altor parametri. Investigarea ulterioară a constatat în examinarea efectelor Auraguard la concentrația de 0.125% asupra factorilor de virulență ai *S. aureus*, *S. pyogenes* și *E. faecalis*, cu accent pe formarea de biofilm și producția de exopolizaharide (EPS). La această concentrație, Auraguard a demonstrat un efect subinhibitor asupra creșterii bacteriene, fără a afecta viabilitatea acestora. Capacitatea de formare a biofilmului și producția de EPS au fost semnificativ reduse, sugerând că Auraguard ar putea diminua

virulența acestor patogeni prin inhibarea acestor factori cruciali, contribuind astfel la o virulență redusă față de celulele epiteliale.

Pentru a evalua integritatea membranei bacteriene, s-au efectuat teste de scurgere a membranei (LDH) în urma expunerii la Auraguard la concentrațiile de 0.125% și 0.25%. Eliberarea de LDH a fost semnificativ mai mică în cazul tratamentului cu 0.125% Auraguard, indicând că la această concentrație nu au fost cauzate deteriorări semnificative ale membranei. În schimb, la 0.25%, Auraguard a manifestat activitate bactericidă. De asemenea, Auraguard nu a indus eliberarea de LDH din celulele D6234 expuse, validând caracterul său necitotoxic.

Prin efectuarea unui test de infecție *in vitro*, s-a constatat că Auraguard la 0.125% a redus semnificativ capacitatea *S. aureus*, *S. pyogenes* și *E. faecalis* de a adera la celulele epiteliale orale primare D6234. Aceasta a fost însoțită de o creștere a rezistenței transepiteliale (TEER) și a confirmat faptul că, la această concentrație, viabilitatea celulelor D6234 nu a fost afectată. Aceste rezultate sugerează că Auraguard poate preveni adeziunea bacteriilor la celulele epiteliale orale și poate contribui la restaurarea integrității celulare în timpul infecției. Investigațiile ulterioare s-au concentrat asupra impactului Auraguard asupra răspunsului inflamator al celulelor epiteliale orale primare D6234 în contextul infecției cu *S. aureus*, *S. pyogenes* și *E. faecalis*. Analizele au evidențiat că Auraguard la 0.125% a redus semnificativ expresia ARN mesager pentru citokinele inflamatorii IL-1 $\beta$  și IL-8 după 3 ore de infecție. Acest efect antiinflamator a fost confirmat de scăderi semnificative în producția de enzime ale IL-1 $\beta$  și IL-8, precum și de o reducere concomitentă a COX-2, mediatorul de expresie al acestor citokine. Aceste constatări indică faptul că **Auraguard** are un efect benefic asupra reducerii inflamației induse de patogeni.

În lumina rezultatelor precedente, care indicau implicarea Auraguard în restabilirea integrității membranei celulare și reducerea efectelor inflamatorii, s-a explorat, de asemenea, impactul său asupra eliberării de peroxid de hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de către celulele infectate. La concentrația de 0.125%, Auraguard a redus semnificativ eliberarea de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de către *S. aureus*, *S. pyogenes* și *E. faecalis*, posibil prin stimularea enzimelor antioxidante precum superoxid-dismutaza (SOD) și catalaza (CAT). În plus, s-a arătat că Auraguard influențează negativ reglarea COX-2, un factor cheie în răspunsul inflamator, și indică faptul că acest amestec antimicrobian poate avea un rol semnificativ în reducerea inflamației prin modularea eliberării de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> și reglarea negativă a COX-2.

Următorul capitol, **Capitolul 5** al tezei de doctorat, intitulat „**Investigarea efectului Citrox BCL asupra mecanismelor de formare a biofilmului bacterian, stresului oxidativ și virulenței *Legionella pneumophila***”, examinează efectul Citrox BCL asupra formării și virulenței biofilmului *Legionella pneumophila*. Cu scopul de a determina concentrațiile subinhibitoare ale Citrox BCL și de a examina influența acestuia asupra virulenței și modificărilor asociate cu *L. pneumophila*, au fost identificate inițial valorile concentrației minime inhibitoare și concentrației minime bactericide. CMI a fost confirmată la nivelul de 0.06%, iar CMB a fost stabilită la 0.125%. Analiza curbelor de creștere ale *L. pneumophila* a indicat o inhibare totală la ambele concentrații, conform așteptărilor. Cu toate acestea, concentrațiile de 1/2 CMI (0.25% v/v) de 0.04% au provocat o prelungire a fazei de latență, în timp ce 0.02% a prezentat o curba de creștere similară cu controlul, sugerând absența unui defect semnificativ de creștere. Prin urmare, s-a selectat concentrația subinhibitoare de 0.02% pentru a investiga consecințele asupra formării de biofilm și virulenței *in vitro*.

Obiectivul inițial al studiului a constat în determinarea unei concentrații subinhibitoare de 0.02% Citrox BCL pentru a preveni invazia celulelor A549 de către *L. pneumophila*. După 24 de ore de infecție, s-a constatat o reducere semnificativă a prezenței intracelulare a *L. pneumophila* atunci când celulele A549 sau bacteriile au fost pretratate cu 0.02% Citrox BCL. Asemenea rezultate au fost obținute și în condițiile în care Citrox BCL a fost prezent în mediul de cultură pe parcursul întregii perioade de infecție de 24 de ore, determinând o diminuare a prezenței intracelulare a *L. pneumophila*. Pentru a evalua posibilele efecte citotoxice ale Citrox BCL asupra celulelor A549, s-au măsurat nivelurile de LDH, indicând că Citrox BCL nu a manifestat efect citotoxic. Aceste rezultate indică faptul că Citrox BCL poate reduce invazia *L. pneumophila*, sugerând un impact dublu asupra celulelor A549 și asupra bacteriilor însăși.

Etapa ulterioară a investigat mecanismele biologice implicate în infecția celulelor A549 de către *L. pneumophila*. O ipoteză propusă, conform căreia nivelurile de mesager c-di-GMP în *L. pneumophila* sunt reduse în prezența Citrox BCL și sunt restaurate semnificativ în absența acestuia, a fost confirmată. Nivelurile de c-di-GMP au fost măsurate și într-un scenariu de cocultură cu celulele A549, obținându-se rezultate similare, indicând că Citrox BCL acționează direct asupra *L. pneumophila*. Scăderea nivelurilor de c-di-GMP a fost asociată cu o reducere semnificativă a formării de biofilm după 24 de ore în prezența a 0.02% Citrox BCL. Nivelurile crescute de c-di-GMP în absența Citrox BCL au fost, de asemenea, corelate cu niveluri mai mari de specii reactive de oxigen (ROS) în celulele A549 infectate. S-a presupus, de asemenea, că reducerea observată a virulenței și formării de biofilm este însoțită de o scădere a expresiei a două gene majore de virulență, *tatB* și *tatC*. Rezultatele au evidențiat o reducere semnificativă a expresiei ambelor gene într-un mod dependent de timp, între 3 și 24 de ore. Scăderea observată a formării de biofilm sugerează că producția de c-di-GMP poate regla exopolizaharidele (EPS), inhibând astfel formarea de biofilm a *L. pneumophila*. Datele au arătat că concentrația de EPS a scăzut semnificativ în timpul creșterii *L. pneumophila* în prezența a 0.02% Citrox BCL. De asemenea, s-a constatat că o concentrație subinhibitoare de 0.02% a determinat o reducere de aproximativ 45% în producția de EPS în comparație cu culturile de control și netratate ale *L. pneumophila*. În plus, s-a demonstrat că o reducere semnificativă a mobilității a fost obținută utilizând o concentrație subinhibitoare de 0.02%. Aceste constatări sugerează că reducerea anterioară a formării de biofilm este, de asemenea, asociată cu reducerea formării de biofilm, respectiv EPS și mobilitate, în urma expunerii la 0.02% Citrox BCL.

Pentru a obține o înțelegere mai detaliată a mecanismelor implicate în reducerea biofilmului, s-a examinat impactul Citrox BCL asupra genelor de sechestrare a fierului *pvcA* și *pvcB*, precum și asupra activității sideroforelor. Rezultatele au evidențiat o reducere semnificativă a expresiei genelor *pvcA* și *pvcB* după 24 de ore în prezența a 0.02% Citrox BCL. Această scădere a expresiei genelor a fost asociată cu o diminuare semnificativă în detectarea sideroforelor în supernatantul culturii în prezența a 0.02% Citrox BCL. Reducerea eliberării sideroforelor a fost probabil cauzată de numărul redus de celule *L. pneumophila*, conducând la nivele mai scăzute de Fe<sup>2+</sup> și Fe<sup>3+</sup> detectate în biofilmurile formate în prezența a 0.02% Citrox BCL. Aceste descoperiri susțin ideea că Citrox BCL poate juca un rol semnificativ în reducerea formării de biofilm prin intermediul scăderii capacității *L. pneumophila* de sechestrare a fierului necesar pentru creștere și supraviețuire.

În **Capitolul 6**, sunt prezentate cercetările privind utilizarea a unui amestec de acizi organici (AuraAqua) asupra creșterii și activității bacteriilor probiotice comensale *Faecalibacterium prausnitzii* în mediile acvatice. Pentru a examina potențialul de îmbunătățire a creșterii bacteriei *F. prausnitzii* sub influența Aq, s-a efectuat o

cultură a bacteriei în prezența concentrațiilor de 0.2%, 0.5%, 1% și 2% Aq. Evaluarea creșterii bacteriene a fost realizată pe o perioadă de 24 de ore, monitorizând variațiile în densitatea optică. S-a constatat că concentrațiile de 0.2% și 0.5% Aq au stimulat în mod semnificativ creșterea *F. prausnitzii* în condiții anaerobe, cu un efect maxim la concentrația de 0.5%. Concentrațiile de 1% și 2% Aq au prezentat, de asemenea, o îmbunătățire a creșterii în comparație cu controlul netratat, dar diferența nu a atins semnificație statistică. Aceste constatări indică faptul că amestecurile de antimicrobiene naturale pot, într-adevăr, să sprijine creșterea *F. prausnitzii*, cu o eficacitate maximă la concentrația de 0.5%. În plus, impactul Aq asupra abundenței relative a bacteriilor care conțin gena de transferază a butiril-CoA (*But*) a fost evaluat pentru a investiga potențiala influență asupra producției de butirat. Rezultatele au indicat o creștere semnificativă a eliberării de butirat în supernatantele de cultură în prezența Aq, cu cel mai pronunțat efect la concentrația de 0.5% Aq. Concentrațiile de 1% și 2% Aq au prezentat, de asemenea, o creștere semnificativă a producției de butirat în comparație cu controlul, dar fără diferențe semnificative față de concentrația de 0.5%, sugerând că un platou a fost atins peste această concentrație.

O investigație ulterioară a examinat dacă Aq poate promova creșterea *F. prausnitzii* într-un model *in vitro* de intestin de creveți. Rezultatele au evidențiat un efect semnificativ al Aq asupra abundenței relative a *F. prausnitzii* la toate concentrațiile testate în comparație cu grup de control, cu o influență pozitivă între 6 și 24 de ore de incubație, maximul fiind atins la 0.5% Aq. Nu s-au observat creșteri suplimentare ale impactului la concentrațiile de 1% sau 2% Aq. Aceste constatări indică faptul că Aq poate îmbunătăți abundența relativă a *F. prausnitzii* în intestin, având potențialul de a contribui la sănătatea intestinală. Într-un model de intestin de creveți cu fecale iradiate și adăugarea ulterioară a *F. prausnitzii*, s-a constatat un efect semnificativ de promovare a creșterii al Aq asupra *F. prausnitzii* între 12 și 24 de ore de incubație. Această creștere bacteriană a fost asociată cu o creștere semnificativă în formarea de butirat între 12 și 24 de ore în comparație cu controlul.

Studiul următor și-a propus să demonstreze dacă creșterea observată în producția de butirat se datorează unui consum crescut de substrat de către *F. prausnitzii*. Un experiment a fost efectuat utilizând trei grupuri de control și un grup experimental pentru a evalua efectul concentrației de 0.5% Aq asupra capacității *F. prausnitzii* de a produce butirat și de a utiliza substratul disponibil celulozic. S-a constatat că *F. prausnitzii* a crescut semnificativ mai lent în absența Aq în comparație cu grupul experimental și în prezența Aq. Aceași tendință a fost observată și în măsurarea producției de butirat. Datele au relevat, de asemenea, că creșterea bacteriană a fost asociată cu un consum crescut de substrat, cu peste 9% din substrat consumat de *F. prausnitzii* în 24 de ore de incubație, în timp ce în lotul control a fost mai puțin de 4%.

Ultimul scop al studiului a fost să demonstrăm dacă expunerea *F. prausnitzii* la Aq afectează capacitatea sa de a reduce colonizarea și infecția cu *Vibrio parahaemolyticus* A3 a celulelor SGP. *F. prausnitzii* a fost cultivat în absența sau prezența a 0.5% Aq înainte de colonizarea celulelor SGP pentru a evita efectele directe ale Aq asupra *V. parahaemolyticus* A3 sau asupra celulelor SGP. În absența Aq, *F. prausnitzii* a redus atașarea și invazia *V. parahaemolyticus* A3 în celulele SGP în comparație cu controalele neinfectate și netratate. În plus, atunci când celulele SGP au fost colonizate cu *F. prausnitzii* pre-expus la 0.5% Aq, nivelurile de adeziune și invazie ale *V. parahaemolyticus* A3 au fost reduse în continuare în comparație cu lotul control. Nivelurile de infecție ale *V. parahaemolyticus* A3 în grupul experimental au prezentat o reducere semnificativă în adeziune.



Substanțe antimicrobiene naturale oferă soluții promițătoare pentru abordarea provocărilor bacteriilor patogene și a biofilmelor în zootehnie. Prin reducerea dependenței de antibiotice, îmbunătățirea bunăstării animalelor, asigurarea siguranței alimentare și susținerea practicilor durabile, aceste alternative pot revoluționa controlul bolilor în zootehnie. Continuarea cercetării și adoptarea practică a acestor intervenții noi sunt esențiale pentru promovarea unui sector zootehnic rezistent și durabil. Progresele obținute în cercetare de față cum ar fi efectele antioxidante ale unor substanțe cu rol antimicrobian (Auraguard), reducerea formării biofilmului bacterian, îmbunătățirea probiotică (AuraAqua) sau suprimarea biofilmului și genelor formatoare de biofilm bacterian (Citrox BCL) deschid calea pentru noi perspective, implicând studii ce combină diverși compuși antimicrobieni, generând o acțiune sinergică care ar putea spori potențialul antimicrobian împotriva patogenilor. Studiile viitoare ar trebui să exploreze efectele sinergice ale amestecurilor antimicrobiene pe modelele de boli la animale și să le compare cu antibioticele tradiționale. De asemenea, cercetarea ar trebui extinsă la alte animale de fermă și specii acvatice pentru a evalua efectele probiotice *in vivo* și beneficiile generale ale amestecurilor antimicrobiene. Nu în ultimul rând, sunt necesare studii suplimentare pentru a descoperi mecanismele biologice precise prin care preparatele antimicrobiene naturale reduc formarea biofilmului și virulența bacteriilor patogene. Iar eforturile ar trebui să se concentreze pe reducerea decalajului dintre descoperirile științifice și adoptarea practică în agricultură, subliniind beneficiile de mediu, sănătate și siguranță ale antimicrobienilor naturali.

**ABSTRACT OF THE Ph.D. THESIS**

**THE APPLICATION OF BIOCIDES FOR DECREASING THE  
NUMBER OF PATHOGENS IN SHELTERS AND PREVENTING  
INFECTIONS IN FARM ANIMALS**

*Drd. Eng. BUTUCEL Eugenia*

*Scientific coordinators:*

*Prof. Dr. Eng. ŞTEF Lavinia*

*Prof. Dr. Eng. CORCIONIVOSCHI Nicolae*

**KEY WORDS:** *pathogens, bacterial biofilm, phytochemicals, probiotics, prebiotics, gene expression, antioxidant activity, butyrate, transepithelial electrical resistance, extracellular polymeric substance, oxidative stress, reactive oxygen species, oral infection, virulence, primary epithelial cells*

The doctoral thesis titled „**The Application of Biocides for Decreasing the Number of Pathogens in Shelters and Preventing Infections in Farm Animals**” is structured into two main parts: bibliographic documentation and personal contributions. The doctoral thesis comprises six chapters in addition to the utilised bibliographic references. The entire work amounts to 130 pages, 8 tables, 21 figures, and 310 bibliographic references.

The presence of infectious agents in food and water is a major concern for the food industry, healthcare personnel, and consumers because of the increasing resistance of pathogens to biocidal substances, resulting in significant economic consequences, higher mortality rates, increased treatment costs, and lack of confidence in medicine. Agriculture, a major reservoir of resistant pathogens, often witnesses the formation of biofilms and resistance to both biocides and antibiotics, making disinfection a vital component of the overall biosecurity strategy aimed at preventing and eliminating various pathogens that cause damage to agriculture, health, and the food industry.

Recent studies have suggested the potential for cross-resistance of pathogenic bacteria to both antibiotics and biocides, highlighting the need for more judicious use of these substances and prevention of their contamination of water and soil, which can lead to uncontrolled release into the environment and emergence of bacterial resistance. Bacterial resistance to biocides may originate from genetic mutations, changes in the cell envelope, activation of efflux pumps, or the expression of enzymes that degrade biocides. Consequently, there is a continuous search for new and effective biocides derived from natural sources, including plants, peptides, enzymes, and entirely new biocide products to address this growing challenge.

The doctoral thesis titled "*The Use of Biocides in Reducing Pathogens in Shelters and Preventing Infections in Farm Animals*" is part of the research field of research groups within the University of Agricultural

Sciences "King Mihai I" of Timișoara, which collaborates with the Agri-Food Biosciences Institute in Belfast, United Kingdom.

This project has substantial practical significance, as it explores the potential of innovative antimicrobial products to improve hygiene standards in industrial environments, including animal farms. Development of new products with bactericidal and bacteriostatic properties has the potential to benefit farmers. These substances can effectively reduce colonisation of the animal microbiota by pathogenic agents of the ESKAPE species, such as *Escherichia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Listeria*, and *Campylobacter*, which are known to cause foodborne infections and severe gastrointestinal conditions. This doctoral project addressed the critical need to find alternatives to antibiotics and common disinfectants used in agriculture owing to the increasing challenge of antimicrobial resistance. The main objective of this doctoral thesis was to address the challenges posed by antimicrobial resistance in agriculture by exploring innovative antimicrobial solutions that offer potential benefits for both animal health and the agricultural industry.

This project introduces novelty in the field of antimicrobial products, focusing on plant-derived compounds, such as polyphenols, essential oils, and organic acids, as alternatives to antibiotics. This innovative approach addressed the urgent need to reduce antibiotic dependence and combat antibiotic resistance. The use of nanoemulsification to produce these products represents a significant progress, making them highly soluble and applicable in various industries.

To achieve the research goal of this thesis, several objectives were defined:

- Conducting an extensive analysis of the literature to understand the biological mechanisms of action of biocides against common foodborne pathogens.
- Investigating the role of biosecurity and farm management practices in attenuating bacterial biofilm formation on animal farms.
- Examining the impact of a natural antimicrobial agent on the virulence, adherence, and invasion of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Enterococcus faecalis* in primary oral epithelial cells.
- Exploring the molecular mechanisms underlying the antimicrobial properties of a natural mixture and its ability to inhibit *Legionella pneumophila* biofilm formation, and examining its impact on gene expression and bacterial behaviour.
- Evaluate the *in vitro* potential of the antimicrobial mixture in promoting the growth of commensal bacteria *Faecalibacterium prausnitzii* and assess its effectiveness in combating *Vibrio parahaemolyticus* using primary shrimp intestinal cells (SGP) as a model system.

The doctoral thesis titled "*The Application of Biocides for Decreasing the Number of Pathogens in Shelters and Preventing Infections in Farm Animals*" is structured into two main parts. The first part consists of four chapters presenting the current state of knowledge according to the proposed objectives, addressing aspects related to farm management and biosecurity strategies, biocides currently used in the industry, and their mechanisms of action against foodborne pathogenic biofilm-forming bacteria. The second part consists of three chapters and reflects on the doctoral research work, materials and methods used, results obtained, conclusions, and discussions.

The first part of the doctoral thesis comprises 29 pages, representing approximately 36 % of the total volume of the thesis.

**Chapter 1**, titled „**The efficacy of interventions and measures associated with farm biosecurity**”, presents recent intervention strategies aimed at reducing and combating bacterial biofilm formation on livestock farms. The purpose of this chapter is to underline the importance of biosecurity and farm management practices and to assess their impact on bacterial biofilm formation.

**Chapter 2**, titled „**Biocides as a sustainable strategy against pathogenic bacteria**”, describes biocides with inhibitory effects against foodborne bacteria, namely metal-based biocides, aldehydes, alcohols, phenols, bisphenols, halogens, peroxides, organic acids, QACs, and phytochemicals. The responsible use and development of these biocides are crucial for effective disinfection and disease prevention. The second part of the chapter addresses the antimicrobial activity of the biocidal products. This chapter describes a series of processes involved in the action of antimicrobial agents against pathogenic bacteria. It has been proven that the antimicrobial effect is based on the dynamic interaction between the active substance and specific targets inside the microbial cell.

**Chapter 3**, titled „**Current state of research in the field of biocide use against foodborne pathogenic bacteria**” describes the biological mechanisms of action of biocides against common foodborne pathogens (e.g. *Escherichia* spp., *Staphylococcus* spp., *Campylobacter* spp., and *Klebsiella* spp.).

The following chapters, namely, the section on original research and the present studies conducted during the doctoral years. The research was carried out in the laboratories of the Agri-Food Biosciences Institute in Belfast, Bacteriology Branch, Belfast, United Kingdom. The biological material used in the experiments consisted of pathogenic bacteria from the AFBI laboratory collection. The second part of the doctoral thesis spans 48 pages, accounting for 64% of the total volume of the thesis, including one table and 15 figures.

In **Chapter 4**, the impact of natural antimicrobial substances on antioxidant inhibition of the COX-2-mediated inflammatory response was investigated in primary oral cells infected with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Enterococcus faecalis*. One of the fundamental objectives of this chapter is to evaluate the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of Auraguard against relevant pathogens. Antimicrobial activity was evident at a minimum inhibitory concentration of 0.25% for all the tested strains, followed by a minimum bactericidal concentration of 0.50%. To assess the subinhibitory effect, a concentration of 0.125% was chosen, which did not affect bacterial growth but had an effect on other parameters. Further investigation was conducted to examine the effects of Auraguard at a concentration of 0.125% on the virulence factors of *S. aureus*, *S. pyogenes*, and *E. faecalis*, with a focus on biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production. At this concentration, Auraguard demonstrated a subinhibitory effect on bacterial growth without affecting their viability. The biofilm formation capacity and EPS production were significantly reduced, suggesting that Auraguard could reduce the virulence of these pathogens by inhibiting these crucial factors, thereby contributing to reduced virulence against epithelial cells.

To assess bacterial membrane integrity, membrane leakage tests (LDH) were performed following exposure to Auraguard at concentrations of 0.125% and 0.25%. LDH release was significantly lower with 0.125% Auraguard treatment, indicating that no significant membrane damage was caused at this concentration. In contrast, at 0.25%, auraguard exhibited bactericidal activity. Additionally, Auraguard did not induce LDH release from exposed D6234 cells, validating its non-cytotoxic nature.

An *in vitro* infection test showed that Auraguard at 0.125% significantly reduced the ability of *S. aureus*, *S. pyogenes*, and *E. faecalis* to adhere to primary oral epithelial cells, D6234. This was accompanied by an increase in transepithelial resistance (TEER) and confirmed that at this concentration, the viability of D6234 cells was not

affected. These results suggest that Auraguard can prevent bacterial adhesion to oral epithelial cells, and may contribute to the restoration of cellular integrity during infection. Further investigations focused on the impact of Auraguard on the inflammatory response of primary oral epithelial cells D6234 in the context of infection with *S. aureus*, *S. pyogenes*, and *E. faecalis*. Analyses revealed that Auraguard at 0.125% significantly reduced the mRNA expression of the inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-8 after 3 h of infection. This anti-inflammatory effect was confirmed by a significant decrease in the production of IL-1 $\beta$  and IL-8 enzymes, as well as a concomitant reduction in COX-2, the mediator of the expression of these cytokines. These findings indicate that auraguard has a beneficial effect in reducing inflammation induced by pathogens.

In light of previous results, which indicated Auraguard's involvement in restoring cell membrane integrity and reducing inflammatory effects, its impact on hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) release by infected cells was also explored. At a concentration of 0.125%, Auraguard significantly reduced the release of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by *S. aureus*, *S. pyogenes*, and *E. faecalis*, possibly by stimulating antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Additionally, Auraguard negatively influences COX-2 regulation, a key factor in the inflammatory response, indicating that this antimicrobial mixture may play a significant role in reducing inflammation by modulating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release and COX-2 downregulation.

The next chapter of doctoral thesis, **Chapter 5** titled „**Investigation of the effect of Citrox BCL on the mechanisms of this of biofilm formation, oxidative stress, and virulence *Legionella pneumophila*** ” examines the effect of Citrox BCL on the formation and virulence of *Legionella pneumophila* biofilms. To determine the subinhibitory concentrations of Citrox BCL and to examine its influence on virulence and associated changes in *L. pneumophila*, the initial values of the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration were determined. The MIC was 0.06%, and the MBC was 0.125%. Analysis of the growth curves of *L. pneumophila* indicated total inhibition at both concentrations, as expected. However, concentrations of 1/2 MIC (0.25% v/v) of 0.04% caused an extension of the lag phase, while 0.02% caused a growth curve similar to that of the control, suggesting the absence of a significant growth defect. Therefore, a subinhibitory concentration of 0.02% was selected to investigate its effects on biofilm formation and virulence *in vitro*.

The initial objective of this study was to determine whether a sub-inhibitory concentration of 0.02% Citrox BCL could prevent the invasion of A549 cells by *L. pneumophila*. After 24 h of infection, a significant reduction in the intracellular presence of *L. pneumophila* was observed when A549 cells or bacteria were pre-treated with 0.02% Citrox BCL. Similar results were obtained under conditions where Citrox BCL was present in the culture medium throughout the entire 24-hour infection period, resulting in a decrease in the intracellular presence of *L. pneumophila*. To evaluate the possible cytotoxic effects of Citrox BCL on A549 cells, LDH levels were measured, which indicated that Citrox BCL did not exhibit cytotoxic effects. These results indicate that Citrox BCL can reduce the invasion of *L. pneumophila*, suggesting a dual effect on both A549 cells and the bacteria themselves.

Subsequently, the biological mechanisms involved in *L. pneumophila* infection in A549 cells were investigated. c-di-GMP messenger levels in *L. pneumophila* were reduced in the presence of Citrox BCL and significantly restored in its absence. Levels of c-di-GMP were measured in a co-culture scenario with A549 cells, yielding similar results, indicating that Citrox BCL acts directly on *L. pneumophila* without the involvement of A549 cellular mediators. The decrease in c-di-GMP levels was associated with a significant reduction in biofilm formation after 24 h in the presence of 0.02% Citrox BCL. Increased levels of c-di-GMP in the absence of Citrox

BCL were also correlated with higher levels of reactive oxygen species (ROS) in infected A549 cells. It was also hypothesized that the observed reduction in virulence and biofilm formation is accompanied by a decrease in the expression of two major virulence genes, *tatB* and *tatC*. The results showed a significant decrease in the expression of both genes in a time-dependent manner between 3 h and 24 h. The observed decrease in biofilm formation suggests that c-di-GMP production may regulate exopolysaccharides (EPS), thereby inhibiting *L. pneumophila* biofilm formation. The data showed that the EPS concentration significantly decreased during *L. pneumophila* growth in the presence of 0.02% Citrox BCL. Additionally, a sub-inhibitory concentration of 0.02% resulted in a reduction of approximately 45% in EPS production compared to the control and untreated cultures of *L. pneumophila*. Furthermore, a significant reduction in mobility was achieved using a sub-inhibitory concentration of 0.02%. These findings suggest that the previous reduction in biofilm formation is also associated with reductions in two factors responsible for biofilm formation, EPS and mobility, following exposure to 0.02% Citrox BCL.

To obtain a more detailed understanding of the mechanisms involved in biofilm reduction, the impact of Citrox BCL on the iron-sequestering genes *pvcA* and *pvcB*, as well as siderophore activity, was examined. The results showed a significant reduction in the expression of *pvcA* and *pvcB* after 24 h in the presence of 0.02% Citrox BCL. This decrease in gene expression was associated with a significant decrease in siderophore detection in the culture supernatant in the presence of 0.02% Citrox BCL. The reduction in siderophore release was likely caused by the reduced number of *L. pneumophila* cells, leading to lower levels of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  in biofilms formed in the presence of 0.02% Citrox BCL. These findings support the idea that Citrox BCL may play a significant role in reducing biofilm formation by decreasing the ability of *L. pneumophila* to sequester the iron necessary for growth and survival.

**Chapter 6** presents research on the use of a mixture of organic acids (AuraAqua) on the growth and activity of the commensal probiotic bacteria *Faecalibacterium prausnitzii* in aquatic environments. To examine the potential for improving *F. prausnitzii* growth under the influence of Aq, a bacterial culture was conducted in the presence of concentrations of 0.2%, 0.5%, 1%, and 2% Aq. Bacterial growth was evaluated over a 24-hour period, and variations in optical density were monitored. It was found that concentrations of 0.2% and 0.5% Aq significantly stimulated the growth of *F. prausnitzii* under anaerobic conditions, with a maximum effect observed at 0.5% concentration. Concentrations of 1% and 2% Aq also showed improved growth compared to that of the untreated control, but the difference was not statistically significant. These findings indicate that mixtures of natural antimicrobials can indeed support *F. prausnitzii* growth, with maximum efficacy at a 0.5% concentration. Additionally, the effect of Aq on the relative abundance of bacteria containing the butyryl-CoA transferase (*But*) gene was evaluated to investigate its potential influence on butyrate production. The results indicated a significant increase in butyrate release in culture supernatants in the presence of Aq, with the most pronounced effect at 0.5% Aq. Concentrations of 1% and 2% Aq also showed a significant increase in butyrate production compared to the control, but without significant differences from the 0.5% concentration, suggesting that a plateau was reached beyond this concentration.

Further investigation was conducted to examine whether Aq could promote *F. prausnitzii* growth in an *in vitro* shrimp intestinal model. The results highlighted a significant effect of Aq on the relative abundance of *F. prausnitzii* at all tested concentrations compared with the control, with a positive influence between 6 and 24 h of incubation, reaching a maximum at 0.5% Aq. No additional growth effects were observed at concentrations of 1% or 2% Aq. These findings indicate that Aq can improve the relative abundance of *F. prausnitzii* in the intestine

and potentially contribute to intestinal health. In a shrimp intestine model with irradiated faeces and the subsequent addition of *F. prausnitzii*, a significant growth-promoting effect of Aq on *F. prausnitzii* was observed between 12 and 24 h of incubation. This bacterial growth was associated with a significant increase in butyrate formation between 12 and 24 h compared to the control.

The next goal of this study was to demonstrate that the observed increase in butyrate production was due to the increased substrate consumption by *F. prausnitzii*. An experiment was conducted using three controls and one experimental group to assess the effect of 0.5% Aq on the ability of *F. prausnitzii* to produce butyrate and utilise the available cellulose substrate. It was found that *F. prausnitzii* grew significantly slower in the absence of Aq compared to the experimental group and in the presence of Aq. The same trend was observed when butyrate production was measured. The data also revealed that bacterial growth was associated with increased substrate consumption, with over 9% of the substrate consumed by *F. prausnitzii* after 24 h of incubation, whereas in the control batch, it was less than 4%.

The final aim of the study was to demonstrate whether exposure of *F. prausnitzii* to Aq affects its ability to reduce colonization and infection with *Vibrio parahaemolyticus* A3 in SGP cells. *F. prausnitzii* was cultured in the absence or presence of 0.5% Aq before colonization of SGP cells to avoid direct effects of Aq on *V. parahaemolyticus* A3 or SGP cells. In the absence of Aq, *F. prausnitzii* reduced the attachment and invasion of *V. parahaemolyticus* A3 into SGP cells compared with uninfected and untreated controls. Additionally, when SGP cells were colonised with *F. prausnitzii* pre-exposed to 0.5% Aq, the levels of adhesion and invasion of *V. parahaemolyticus* A3 were further reduced compared to those in the control group. Infection levels of *V. parahaemolyticus* A3 in the experimental group showed a significant reduction in adhesion.

The use of natural antimicrobial substances is a promising solution to address the challenges posed by pathogenic bacteria and biofilms in livestock. These alternatives offer ways to reduce antibiotic dependence, improve animal welfare, ensure food safety, and support sustainable practices. Continued research and practical adoption of these new interventions are essential to promote a resilient and sustainable livestock sector. Recent advancements in research, including the antioxidant effects of substances with antimicrobial properties (such as Auraguard), reduction of bacterial biofilm formation, improvement of probiotics (such as AuraAqua), and suppression of biofilm- and bacterial biofilm-forming genes (such as Citrox BCL), have opened up new perspectives. Studies that combine various complexes of antimicrobial compounds to generate a synergistic action that enhances antimicrobial potential against pathogens are needed. Future studies should explore the synergistic effects of these antimicrobial mixtures in animal disease models and compare them with traditional antibiotics. In addition, research should be extended to other farm animals and aquatic species to evaluate the general benefits of antimicrobial mixtures. Finally, further studies are required to uncover the precise biological mechanisms by which natural antimicrobial preparations reduce biofilm formation and virulence of pathogenic bacteria. Efforts should focus on bridging the gap between scientific discovery and practical adoption in agriculture by emphasising the environmental, health, and safety benefits of natural antimicrobials.